



ÖSTERREICHISCHES
PATENTAMT

(52) Klasse: 30 I 001/02
(51) Int.Cl.³: A61L 015/01

A61L 015/06

AM

(19)

AT PATENTSCHRIFT

(11)

Nr. 359 652

(73) Patentinhaber: IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT FÜR CHEMISCH
-MEDIZINISCHE PRODUKTE
WIEN ÖSTERREICH

(54) Gegenstand: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES GEWEBEKLEB-
STOFFES

(61) Zusatz zu Patent Nr.

(62) Ausscheidung aus:

(22)(21) Angemeldet am:

1979 02 15,

1189/79

(23) Ausstellungspriorität:

(33)(32)(31) Unionspriorität:

(42) Beginn der Patentdauer: 1980 04 15

Längste mögliche Dauer:

(45) Ausgegeben am: 1980 11 25

(72) Erfinder: SCHWARZ OTTO DR.

WIEN

ÖSTERREICH

LINNAU YENDRA DR.

WIEN

ÖSTERREICH

LÖBLICH FRANZ ING.

WIEN

ÖSTERREICH

SEELICH THOMAS DR.

WIEN

ÖSTERREICH

(60) Abhängigkeit:

(56) Druckschriften, die zur Abgrenzung vom Stand der Technik in Betracht gezogen wurden:

AT 359 652

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Gewebeklebstoffes auf Basis von menschlichen oder tierischen Proteinen, mit einem Gehalt an Fibrinogen und Faktor XIII.

Es ist seit langem bekannt, Blutgerinnungssubstanzen zur Stillung von Blutungen bzw. für Wundversiegelungen heranzuziehen. Nach den ersten derartigen Vorschlägen wurden Fibrintamppons bzw. 5 Fibrinplättchen verwendet. Während des Zweiten Weltkrieges wurden Gewebeklebungen mit Hilfe von Blutplasma vorgeschlagen.

In letzter Zeit wurde von H. Matras u.a. in der "Wiener Medizinischen Wochenschrift", 1972, Seite 517, ein Gewebeklebstoff auf Basis von Fibrinogen und Faktor XIII zur nahtlosen interfazikulären Nerventransplantation im Tierexperiment beschrieben.

10 Eine weitere Studie stammt von Spängler u.a. in der "Wiener Klinischen Wochenschrift", 1973, Seiten 1 bis 7. Auch hier wurde in Tierversuchen die Möglichkeit aufgezeigt, mit Hilfe von Fibrinogen als Kryopräzipitat und Thrombin eine Gewebeklebung vorzunehmen.

Die bekannten Präparate haben sich noch nicht als zufriedenstellend erwiesen, weil sie die an einen Gewebeklebstoff zu stellenden Forderungen, welche die folgenden sind:

- 15 a) hohe Belastbarkeit der Klebungen bzw. Wundversiegelungen sowie sichere und anhaltende Blutstillung, d.h. gute Haftfähigkeit des Klebers an den Wund- bzw. Gewebsflächen, sowie hohe innere Festigkeit desselben,
- b) regelbare Haltbarkeit der Klebungen im Körper,
- c) vollkommene Resorbierbarkeit des Klebstoffes im Verlauf des Wundheilungsprozesses,
- 20 d) wundheilungsfördernde Eigenschaften,

noch nicht in ausreichendem Maße erfüllen. Dies mag teilweise darauf zurückzuführen sein, daß die für die Blutstillung notwendigen Gerinnungsfaktoren in den bekannten Präparaten nicht in einem optimalen Verhältnis zueinander vorhanden waren und auch daran, daß die fibrinolytische Aktivität im Klebepbereich nur ungenügend beherrscht wurde. Es kam häufig durch enzymatische Einwirkung zu einer vorzeitigen 25 Auflösung der Gewebeklebungen.

Die Erfindung bezweckt die Vermeidung dieser Nachteile und Schwierigkeiten und stellt sich die Aufgabe, einen lyophilisierten Gewebeklebstoff menschlichen oder tierischen Ursprungs zu schaffen, der die weiter oben angeführten Voraussetzungen erfüllt und in lyophilisierter Form vorliegt, wonach wegen der längeren Haltbarkeit und besseren Transport- bzw. Lagerfähigkeit ein Bedürfnis besteht.

30 Die gestellte Aufgabe wird bei einem Verfahren der eingangs erwähnten Art erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß in einer fibrinogenhaltigen Blutplasmafraktion ein Konzentrationsverhältnis von Faktor XIII zu Fibrinogen zu Albumin eingestellt wird, gemäß welchem mindestens 80 Einheiten Faktor XIII pro g Fibrinogen und im Gesamtprotein Fibrinogen und Albumin in einem Verhältnis von 33 bis 90:5 bis 40 enthalten sind, der Blutplasmafraktion ein Plasminogen-Aktivator-Inhibitor oder 35 Plasmin-Inhibitor, vorzugsweise Aprotinin, zugefügt wird und das Produkt lyophilisiert wird.

Zweckmäßig wird dabei aus einem fibrinogenhaltigen Plasma-Kryopräzipitat durch ein- oder mehrfache Behandlung mit einer Pufferlösung, welche Natriumzitrat, Natriumchlorid, einen Plasminogen-Aktivator-Inhibitor oder Plasmin-Inhibitor sowie gegebenenfalls Glycin, Glucose und Saccharose enthält, kältelösliches Plasmaprotein entfernt, der gereinigte Niederschlag gelöst, Humanalbumin zugesetzt und das Produkt 40 lyophilisiert.

Der Blutplasmafraktion wird vorteilhaft Heparin in einer Menge von 0,2 bis 200 IE pro g Fibrinogen zugegeben.

Das Kryopräzipitat wird vorzugsweise aus humanem oder tierischem Frischplasma hergestellt, welches bei -20°C eingefroren wurde. Bei Erhöhung der Temperatur auf 0 bis 2°C wird das Kryopräzipitat 45 gewonnen und durch Zentrifugieren abgetrennt. Der Niederschlag wird durch ein- oder mehrmalige Elution mit der Pufferlösung, die einen p_H -Wert von 6,0 bis 8,0 aufweist, eluiert und bei 0 bis 4°C zentrifugiert, um das kältelösliche Plasmaprotein zu entfernen. Die Behandlung mit der Pufferlösung wird bis zum Erreichen des gewünschten Faktor XIII-Fibrinogen-Verhältnisses durchgeführt.

Der gereinigte Niederschlag wird in einer weiteren Pufferlösung, die Humanalbumin, Glycin und 50 gegebenenfalls Glucose oder Saccharose, einen Plasminogen-Aktivator-Inhibitor oder Plasmin-Inhibitor sowie Heparin enthält und einen p_H -Wert von 6,5 bis 9,0 aufweist, gelöst und auf eine Proteinkonzentration von 4,0 bis 9,0% verdünnt. Die Lösung wird über Membranfilter einer Porengröße bis zu 0,2 μm filtriert, in die Endbehälter abgefüllt und lyophilisiert.

Der so erhaltene lyophilisierte Gewebekleber kann bei Zimmertemperatur oder vorzugsweise bei +4°C gelagert werden; er ist nach Rekonstitution mit Aqua ad iniectabilia, dem wahlweise ein Plasminogen-Aktivator-Inhibitor oder Plasmin-Inhibitor, vorzugsweise Aprotinin, beigefügt werden kann, gebrauchsfertig. Bei der Auflösung des lyophilisierten Präparates ist darauf zu achten, daß die gebrauchsfertige Lösung mindestens 70 mg Fibrinogen pro ml enthält.

Ein erfindungsgemäß hergestellter Gewebeklebstoff weist somit die folgenden Merkmale auf:

- a) er enthält mindestens 33 Gew.-% Fibrinogen,
- b) das Verhältnis des Faktors XIII zu Fibrinogen, ausgedrückt in Einheiten des Faktors XIII pro g Fibrinogen, beträgt mindestens 80,
- c) im Gesamtprotein sind Fibrinogen und Albumin in einem Verhältnis von 33 bis 90:5 bis 40 enthalten,
- d) er hat einen Gehalt an Plasminogen-Aktivator-Inhibitor oder Plasmin-Inhibitor, vorzugsweise Aprotinin, von 250 bis 25000 Kallikrein-Inaktivator-Einheiten (KIE) pro g Fibrinogen,
- e) das Präparat liegt in lyophilisierter Form vor.

Nach einer bevorzugten Ausführungsform enthält der Gewebeklebstoff zusätzlich Glycin, wodurch die Wiederauflösbarkeit des lyophilisierten Produktes verbessert wird.

Weiters kann der Gewebeklebstoff zusätzlich Glucose oder Saccharose enthalten, welche Komponenten ebenfalls die Auflösbarkeit fördern.

Der Gewebeklebstoff kann weiters 0,2 bis 200 IE Heparin pro g Fibrinogen enthalten, wodurch eine stabilisierende Wirkung erreicht wird.

Der erfindungsgemäß erhältliche Gewebeklebstoff besitzt charakteristische Vernetzbarkeitseigenschaften nach der Auflösung, welche nach der Natriumlaurylsulfat-(SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Methode bestimmbar sind. Der Test wird derart durchgeführt, daß nach dem Vermischen des Gewebeklebstoffes mit dem gleichen Volumen einer Lösung, enthaltend 40 µMol CaCl₂ und 15 NIH-Einheiten (US National Institute of Health-Einheiten) Thrombin pro ml, die Mischung bei 37°C inkubiert wird. Der Vernetzungsgrad wird nach Stoppen der Reaktion und reduktiver Spaltung der in den Proteinen enthaltenen Disulfidbrücken durch Zugabe eines Gemisches von Harnstoff, Natriumdodecylsulfat und β-Mercaptoäthanol durch Gelelektrophorese bestimmt. Charakteristisch für den erfindungsgemäßen Gewebeklebstoff ist eine vollständige Vernetzung der Fibrin-γ-Ketten nach 3 bis 5 min und eine mindestens 35%ige Vernetzung der Fibrin-α-Ketten nach 2 h.

Fibrinogen, Albumin und auch kälteunlösliches Globulin im Gesamtprotein sollen im erfindungsgemäß erhältlichen Gewebeklebstoff in einem bestimmten Verhältnis stehen; dieses Verhältnis beträgt 33 bis 90 : 5 bis 40 : 0,2 bis 15.

Der erfindungsgemäß hergestellte Gewebeklebstoff weist eine universelle Anwendbarkeit auf. Er kann zum nahtlosen Verbinden von menschlichen oder tierischen Gewebe- oder Organteilen, zur Wundversiegelung und Blutstillung sowie zur Förderung von Wundheilungen verwendet werden.

Bevorzugte Anwendungsgebiete, für welche der erfindungsgemäß erhältliche Gewebeklebstoff erfolgreich eingesetzt werden kann, sind: Indikationen im Bereich der Hals-, Nasen-, Ohren- und Kieferchirurgie, Zahnheilkunde, Neurochirurgie, plastischen Chirurgie, allgemeinen Chirurgie, Abdominalchirurgie, Thorax- und Gefäßchirurgie, Orthopädie, Unfallchirurgie, Urologie, Ophthalmologie und Gynäkologie.

Vorteilhaft wird vor der Applikation des erfindungsgemäß herstellbaren Gewebeklebstoffes auf das zu verbindende Gewebe eine Mischung von Thrombin und Calciumchlorid dem Klebstoff zugefügt oder auf das Gewebe aufgebracht.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird durch das folgende Beispiel näher erläutert:

21 l humanes, bei -20°C eingefrorenes Frischplasma wurden auf +2°C erwärmt. Das entstandene Kryopräzipitat (435 g) wurde bei +2°C durch Zentrifugieren abgetrennt und bei +2°C mit 4,3 l einer Pufferlösung vom p_H-Wert 6,5, die 6,6 g Na₃-Citrat · 2H₂O, 3,4 g NaCl, 10,0 g Glycin, 13,0 g Glucose · 1 H₂O, 50000 KIE Aprotinin und 200 IE Heparin pro l enthielt, behandelt und nochmals bei +2°C zentrifugiert. Der abgetrennte Niederschlag wurde in einer weiteren Pufferlösung vom p_H-Wert 7,9, welche 35,0 Humanalbumin, 20,0 g Glycin, 50000 KIE Aprotinin und 200 IE Heparin pro l enthielt, gelöst und auf eine Konzentration von 70 mg Protein pro ml verdünnt.

Sodann wurde die Lösung über Membranfilter bis zu einer Porengröße von 0,2 µm steriltfiltriert, zu je 2,2 ml in Endbehälter abgefüllt, tiefgefroren und lyophilisiert. Nach Rekonstitution des lyophilisierten Produktes auf eine Fibrinogenkonzentration von 90 mg/ml zeigte das gebrauchsfertige Gewebeklebstoffpräparat im Vernetzungstest eine vollständige Fibrin-γ-Vernetzung nach 5 min und eine 66%ige Fibrin-α-Vernetzung nach 2 h bei 37°C.

Das Verhältnis der im Gewebeklebstoff enthaltenen Proteine Fibrinogen zu Albumin zu kälteunlöslichem Globulin wurde mit 64,0 : 22,3 : 7,7 festgestellt. Der Heparinegehalt betrug 4,5 IE pro g Fibrinogen. Aprotinin war in einer Konzentration von 1133 KIE pro g Fibrinogen enthalten. Der Gehalt an Faktor XIII betrug 161 Einheiten pro g Fibrinogen. Der Gehalt an Gesamtprotein im lyophilisierten Präparat betrug 72,2%, der Gehalt an Fibrinogen im lyophilisierten Präparat 46,2%.

Die Bestimmungen erfolgten in folgender Weise: Die Bestimmung der Faktor-XIII-Einheiten erfolgte mittels eines Vernetzungstests, bei dem Faktor XIII-freies Fibrinogen als Substrat verwendet und die durch die Zugabe der unbekannten verdünnten Probe bewirkte Fibrinvernetzung als Maß für die darin enthaltene Menge an Faktor XIII diente. Eine entsprechende Eichkurve wurde mit gepooltem humanem Citratplasma erhalten, wobei per definitionem 1 ml Plasma 1 Einheit Faktor XIII enthält. Die quantitativen Proteinbestimmungen erfolgten mittels der Methode nach Kjeldahl.

Die Bestimmung der Proteine relativ zueinander erfolgte ebenfalls nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Methode, u.zw. a) mit einer nicht reduzierten und b) mit einer mit β-Mercaptoäthanol reduzierten Probe des Gewebeklebstoffes.

20

P A T E N T A N S P R Ü C H E :

1. Verfahren zur Herstellung eines Gewebeklebstoffes auf Basis von menschlichen oder tierischen Proteinen, mit einem Gehalt an Fibrinogen und Faktor XIII, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß in einer fibrinogenhaltigen Blutplasmafraktion ein Konzentrationsverhältnis von Faktor XIII zu Fibrinogen zu Albumin eingestellt wird, gemäß welchem mindestens 80 Einheiten Faktor XIII pro g Fibrinogen und im Gesamtprotein Fibrinogen und Albumin in einem Verhältnis von 33 bis 90 : 5 bis 40 enthalten sind, der Blutplasmafraktion ein Plasminogen-Aktivator-Inhibitor oder Plasmin-Inhibitor, vorzugsweise Aprotinin, zugefügt wird und das Produkt lyophilisiert wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß aus einem fibrinogenhaltigen Plasma-Kryopräzipitat durch ein- oder mehrfache Behandlung mit einer Pufferlösung, welche Natriumzitrat, Natriumchlorid, einen Plasminogen-Aktivator-Inhibitor oder Plasmin-Inhibitor sowie gegebenenfalls Glycin, Glucose und Saccharose enthält, kältelösliches Plasmaprotein entfernt, der gereinigte Niederschlag gelöst, Humanalbumin zugesetzt und das Produkt lyophilisiert wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß der Blutplasmafraktion Heparin in einer Menge von 0,2 bis 200 IE pro g Fibrinogen zugegeben wird.